



MD 3099 F1 2006.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 3099 (13) F1
(51) Int. Cl.: C08B 37/08 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
<p>(21) Nr. depozit: a 2005 0349 (22) Data depozit: 2005.11.29</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2006.07.31, BOPI nr. 7/2006</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ZADOROJNAI Larisa, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) Procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic și complexului acid hialuronic-proteină

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la un procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic și complexului acid hialuronic-proteină, care pot fi utilizate în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică.

2
Esența invenției constă în aceea că procedeul include spălarea creștelor de cocoși, găini cu apă la temperatura de 10...15°C timp de 5...6 ore, mărunțirea și deshidratarea lor în acetonă sau etanol de 96%, care conține 1% CHCl₃, în raport de 1:3, după care se lasă pentru 6...24 ore la temperatura de 0...4°C, apoi solvenții se separă și se efectuează deshidratarea suplimentară și degresarea cu acetonă în aparatul Soxhlet timp de 2 ore, sedimentul obținut se usucă și se supune extragerii cu soluție apoasă de 1M NaCl în două stadii: I stadiu la rece la 4...10°C și al II-lea stadiu la încălzire până la 50...60°C, totodată la I stadiu se efectuează extragerea în raport de 1:20 de trei ori, se separă reziduul de extract, după care se efectuează sedimentarea acidului hialuronic din extract cu

3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Revendicări: 1
Figuri: 2

MD 3099 F1 2006.07.31

MD 3099 F1 2006.07.31

3

Descriere:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic (AH) și complexului acid hialuronic-proteină, care pot fi utilizate în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică.

5 AH este semicristalin, de culoare albă, solubil în apă și insolubil în solvenți organici. Soluția apoasă posedă o viscozitate înaltă. Macromolecula AH este construită din resturile acidului β -glucuronic și N-acetil- β -D-glucozaminei care alternează liniar, fiind unite consecutiv prin legăturile β - (1 \rightarrow 4) și β - (1 \rightarrow 3) glicozidice. AH izolat din diverse surse conține diferite cantități de proteine. Masa moleculară a AH variază în limitele $7,7 \cdot 10^4 \dots 28 \cdot 10^6$ D în funcție de tipul țesutului conjunctiv, condițiile fiziologice locale, metoda de obținere și purificare, precum și de alți factori. Cu cât este mai mare masa moleculară, cu atât asimetria macromoleculei și viscozitatea soluțiilor vor crește. S-a constatat că în complexul acid hialuronic – proteină, partea proteică ocupă o poziție centrală de tipul unui miez, de la care spre exterior pornesc lanțurile lungi de AH. Ultimul este unul din cele mai importante mucopolizaharide ale țesutului conjunctiv. Conținutul de AH în diverse țesuturi și lichide fiziologice este divers. În cantitate mai mare se conține în culturile de streptococi, în corpul vitros al ochiului, lichidul sinovial, cordonul ombilical, crestele de cocoși, unde se află legat de proteine și, frecvent, alături de alte mucopolizaharide.

Este cunoscut procedeu de obținere a AH ultrapur din creste de cocoși și cordonul ombilical [1]. Procedeu de Balazs constă în extragerea și purificarea hialuronatului de sodiu în mai multe etape consecutive, care durează mult timp și necesită un volum mare de muncă. Materia primă proaspăt colectată după spălare minuțioasă și înlăturarea sângelui prin dializă îndelungată se congelează. În stare congelată se mărunțește și se deshidratează în 3..4 reprize cu cantități mari de etanol de 96% ce conține cloroform. Fiecare procedură durează 24 ore. Extragerea se efectuează cu apă, după care urmează deproteinizarea cu cloroform și NaCl. Dacă conținutul de proteine este mare, autorul utilizează enzimele (Dnase, Rnase, Pronase) după a doua repriză de deproteinizare. Dacă se utilizează numai CHCl_3 , atunci deproteinizarea se realizează în 5 zile la agitare continuă la temperatura de 20..40°C. La resedimentare se utilizează clorura de cetilpiridină.

Tehnologia de obținere a acestui preparat este complicată și necesită un mare volum de muncă și timp îndelungat. Preparatul devine foarte costisitor, datorită complexității purificării lui, utilizării unei cantități enorme de solvenți la toate etapele, îndeosebi la spălare, deshidratare și degresare. Randamentul produsului este mic (0,08%) și produsul nu este lipsit de proteine (0,4%). Viscozitatea cinematică a soluției de 11% la 25°C este de 37,091 cSt. Pentru soluția de 1% (m/v) AH în soluție de 0,15M NaCl $A_{257} = 0,243$, $A_{280} = 0,198$. Absorbanța soluției la lungimile de undă 257 și 280 nm demonstrează prezența nucleotidelor și proteinelor în produsul final obținut.

Este cunoscut procedeu de obținere a AH de uz cosmetic din creste de cocoși [2], unde crestele de cocoși după spălare cu apă rece sunt tratate în multe reprize cu o cantitate considerabilă de etanol de 96% sau izopropanol pentru înlăturarea deplină a sângelui, dezactivarea enzimelor, înlăturarea lipidelor, deshidratarea țesutului. Mărunțirea se efectuează după deshidratare, apoi urmează extragerea AH cu apă sau soluție de 1..15% NaCl timp de 18 ore, la o temperatură nu mai mare de 80°C. Preparatul de AH este sedimentat cu etanol sau acetonă. Randamentul constituie 1,92%, conținutul de proteine 9%, viscozitatea cinematică a soluției apoase de 0,1% - 6,3 cSt, absorbanța la 540 nm - 0,1.

Mărunțirea masei deshidratate este dificilă. Utilizarea unei cantități impunătoare de solvenți la deshidratare și înlăturarea substanțelor bioactive cu efect negativ, conținutul sporit de proteine fac produsul costisitor. Absorbanța soluției la 540 nm nu prezintă informație despre conținutul de acid hialuronic în produs. În acest domeniu absoarbe nu acidul hialuronic, ci complexul acidului glucuronic cu carbazolul.

Este cunoscut procedeu de obținere a AH ultrapur din creste de cocoși și găini [3], unde etapele de spălare, deshidratare și degresare sunt efectuate la fel ca în procedeele precedente, corespunzător, cu apă, etanol cu conținut de 1% cloroform cu cantități mari și în multe reprize. Autorii modifică condițiile de extragere și purificare ulterioară a extractului de AH. Ei utilizează la procesul de extragere 3.. 3,5 volume de apă acidulată cu soluție de 1M CH_3COOH până la pH 3..4 și efectuează extragerea AH la temperatura de 90..100°C timp de 40..60 min, într-o singură repriză. Extractul obținut după filtrare prin vată se prelucrează cu doi sorbenți, mai întâi cu cărbune activat (1%, m/m), apoi cu DEAE-celuloză (firma „Sigma”, SUA cu capacitatea 0,9 mehv./g) în raport de 1 : 1,5, timp de 1..2 ore, la temperatura de 60..80°C. Autorii afirmă că în așa condiții are loc sorbția maximă a proteinelor din extract. În extract rămân 0,8..1,4% proteine. O purificare mai deplină a extractului autorii o efectuează prin filtrare pe hârtie, pe filtre de sticlă cu conținut de bor, pe membrane de acetilceluloză și clorură de polivinil la temperatura de 30..40°C și presiunea de 0,5..0,7 atm.

MD 3099 F1 2006.07.31

4

Randamentul produsului constituie 0,09...0,12%. Viscositatea relativă a soluției de 0,1%, la 20°C este de 12...14, conținutul de proteine este mai mic de 0,1%, inclusiv ovalbumină mai puțin de 0,001%.

Realizarea procesului de extragere la temperatura de 90...100°C în mediul acid poate provoca hidroliza macromoleculor de AH pe legăturile $\beta - (1 \rightarrow 4)$ și $(-)\beta - (1 \rightarrow 3)$ glicozidice. Eliminarea cărbunelui după absorbție, blocarea filtrelor, menținerea temperaturii joase și a presiunii în procesul de lucru sunt dificile. Utilizarea tehnologiilor sofisticate de purificare și randamentul mic fac produsul foarte costisitor.

Este cunoscut procedeul de obținere a AH din creste de cocoși [4], unde crestele de cocoși după spălare se mărunțesc și se congelează la -20...-70°C, se adaugă apă (1 : 2), compoziția se încălzește 15...20 min la temperatura de 90...100°C, se filtrează și procedura se repetă de 3 ori. La filtratele colectate se adaugă acid acetic și se separă produsul. Randamentul constituie 5%, conținutul de proteine după Lowry nu depășește 4%. Masa moleculară 1 mln. Omogenitatea se confirmă prin efectul Tyndall.

Procedeul propus pare a fi simplu, dar autorii nici la o etapă nu înlătură lipidele, nucleotidele și alte substanțe bioactive cu masă moleculară mică, care contaminatează produsul final. Nu se indică nici cantitatea de acid acetic care se utilizează la sedimentarea produsului. Pentru înlăturarea suplimentară a proteinelor autorii propun ca produsul obținut să fie dizolvat în soluție diluată de NaOH, apoi soluția se ultrafiltrează și se liofilizează. Se știe că mediul bazic, ca și mediul acid, provoacă hidroliza macromoleculor de AH pe legăturile glicozidice $\beta - (1 \rightarrow 4)$ și $\beta - (1 \rightarrow 3)$. Ca rezultat la micșorarea cantității de proteine se va micșora și viscositatea soluției și masa moleculară a AH obținut. Menținerea temperaturii scăzute în procesul de lucru necesită un consum suplimentar de energie și face produsul final costisitor. Viscositatea nu este indicată.

Cel mai apropiat procedeu de obținere a AH biocompatibil de uz medicinal, din cordoane ombilicale este [5]. Materialul biologic colectat se spală în 3 reprize cu etanol de 96% (1 : 2), câte 24 ore fiecare, la temperatura de -15...-20°C, până faza etanolică devine transparentă. La masa deshidratată de cordoane ombilicale se adaugă soluție izotonică de NaCl (1 : 2) în 3 reprize a câte 24 ore fiecare, la temperatura de +4°C. Soluția apoasă se scurge și la masa hidratată se adaugă din nou etanol de 96% (1 : 2), pentru 24 ore la temperatura de -15...-20°C. După această procedură cordoanele se mărunțesc (2...4 mm) și din nou se amestecă cu etanol de 96% (1 : 2), în 2 reprize câte 24 ore fiecare, la temperatura de -15...-20°C. Procedura se repetă până faza etanolică devine transparentă. Cordoanele ombilicale mărunțite și spălate în etanol se supun hidratării cu ser fiziologic (1 : 2) în 3 reprize a câte 24 ore fiecare, la temperatura de 0...+4°C. Filtratele se înlătură prin decantare, iar masa de cordoane se supune extragerii cu ser fiziologic (1 : 2) în 3 reprize a câte 24 ore fiecare, la temperatura de +4°C. Fiecare extragere se agită mecanic și soluția de AH se separă prin filtru de tifon separat. La fiecare porție se adaugă NaCl cristalin până la concentrația finală de 25%, se amestecă până la dizolvarea sării și se lasă pentru 24 ore în frigider, apoi se centrifughează la 2500 rot./min timp de 1 oră pentru a înlătura particulele mari de țesut. AH se sedimentează din fiecare porție în formă de sare cu etanol 96% (1 : 3). AH se redizolvă în ser fiziologic și se recrystalizează prin procedura descrisă mai sus de 2...3 ori până când soluția de acid hialuronic devine transparentă. Deproteinizarea se face cu CHCl_3 (1 : 2) la pH 6 în 3...4 reprize. Separarea fazelor se efectuează la centrifugare timp de 30 min și 8000 rot./min. Faza apoasă se colectează și AH se sedimentează prin procedura descrisă mai sus. Randamentul produsului nu este indicat. Concentrația proteinelor după Lowry este de 0,2 g/l, ceea ce constituie 5% din masa totală dizolvată. Astfel autorii consideră că conținutul de AH este de 95%. Viscositatea relativă a soluției de 0,2% AH este 5,0. Pentru soluția de 0,5% AH $A_{257} = 0,712$, $A_{280} = 0,622$. Spectrul densității optice a soluției de AH măsurat în domeniul 400...700 nm demonstrează maxim la 520...540 nm, ceea ce este specific pentru acidul hialuronic, relatează autorii. Absorbanța la 520...540 nm manifestă complexul acidului glucuronic cu carbazolul, dar nu nemijlocit AH. Autorii au testat biologic produsul obținut și au demonstrat lipsa de toxicitate, de alergogenitate, de acțiune hepatotoxică și cardiotoxică, iritantă, și asupra metabolismului mineral.

În procedeul descris pregătirea materiei prime pentru extragerea acidului hialuronic (spălare, deshidratare) este îndelungat, necesită un volum mare de muncă și consum enorm de etanol de 96%, cloroform și apă. Menținerea temperaturii scăzute (-15...-20°C) în procesul de lucru necesită un consum suplimentar de energie. Înlăturarea apelor de la procedura de hidratare provoacă pierdere de AH. Randamentul produsului obținut nu este indicat, dar conținutul relativ sporit de proteine reduce valoarea produsului. Lipsa de materie primă în cantități suficiente pentru producere limitează utilizarea procedurii [5] în scopuri practice.

Dacă din materia primă nu se înlătură pe deplin lipidele și substanțele bioactive cu efect negativ înainte de efectuarea extragerii AH, atunci în procesul de extragere ele contaminatează complexul AH – proteină și înlăturarea lor la următoarea etapă de purificare este dificilă, cu consum sporit de cloroform în mai multe reprize și scăderea randamentului produsului final.

MD 3099 F1 2006.07.31

5

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în lărgirea posibilităților tehnologice de obținere a AH din surse naturale locale ieftine, simplificarea procedeeului tehnologic de obținere și purificare a AH, reducerea timpului de prelucrare a materiei prime cu un volum minim de solvenți, înlăturarea deplină a lipidelor și substanțelor bioactive cu efect negativ, sporirea gradului de extragere a AH, reducerea cheltuielilor pentru obținerea AH de uz medicinal, cosmetic și alimentară.

5

Esența invenției constă în aceea că procedeul include spălarea creștelor de cocoși, găini cu apă la temperatura de 10...15°C timp de 5...6 ore, mărunțirea și deshidratarea lor în acetonă sau etanol 96%, care conține 1% CHCl_3 , în raport de 1:3, după care se lasă pentru 6...24 ore la temperatura de 0...4°C, apoi solventul se separă și se efectuează deshidratarea suplimentară și degresarea cu acetonă în aparatul Soxlet timp de 2 ore, sedimentul obținut se usucă și se supune extragerii cu soluție apoasă de 1M NaCl în două stadii: I stadiu la rece la 4...10°C și al II-lea stadiu la încălzire până la 50...60°C, totodată la I stadiu se efectuează extragerea în raport de 1:20 de trei ori, se separă reziduu de extract, după care se efectuează sedimentarea acidului hialuronic din extract cu etanol 96% în raport de 1:3, sedimentul se redizolvă și se elimină proteinele din el la încălzire și răcire la pH 5,0...5,5, se adaugă CHCl_3 în raport de 1:1, se separă faza apoasă, se tratează cu etanol 96% în raport de 1:3, se separă sedimentul format de hialuronat de sodiu cu un conținut de proteină de cel mult 1%, iar acidul hialuronic se obține la acidularea cu HCl a soluției apoase de hialuronat de sodiu; la al II-lea stadiu reziduu obținut la I stadiu se extrage în raport de 1:3, apoi se sedimentează cu acetonă obținând un complex acid hialuronic-proteină cu un conținut de proteină de 65%.

10

15

20

În procedeul propus ca sursă de materie primă se utilizează creștele de găini și cocoși care pot fi colectate la întreprinderile avicole locale ca subproduse care n-au întrebuințare directă în industria alimentară și sunt o sursă reală de materie primă ieftină la obținerea AH.

Rezultatul invenției constă în obținerea AH din surse naturale locale ieftine - crește de păsări; simplificarea procedeeului tehnologic de obținere și purificare a acidului hialuronic prin utilizarea aparatului Soxlet, care permite reducerea timpului de prelucrare a materiei prime, micșorarea volumului de solvenți organici utilizați și înlăturarea deplină a lipidelor și substanțelor bioactive cu efect negativ; sporirea gradului de extragere a acidului hialuronic prin realizarea procesului de extragere în două stadii, la rece și la încălzire; îmbunătățirea calității produselor obținute; reducerea cheltuielilor pentru obținerea acidului hialuronic de uz medicinal, cosmetic și alimentară.

25

30

Fig. 1. Schema procesului de obținere și purificare a acidului hialuronic și a hialuronatului de sodiu.

Fig. 2. Spectrul de absorbție în IR a hialuronatului de sodiu (P1).

Obținerea AH a fost realizată conform schemei din fig. 1.

35

În acest scop au fost colectate crește de găini și cocoși proaspete, îndată după sacrificarea păsărilor sănătoase de la întreprinderea Avicola „ROSO”, s. Floreni, mun. Chișinău.

40

45

Creștele colectate se spală de sânge cu apă rece (10...15°C) în 2...3 reprize timp de 5...6 ore, apoi se mărunțesc fin (dar nu se omogenizează), astfel ca dimensiunile fragmentelor să fie aproximativ de 1...3 mm. La masa mărunțită se adaugă acetonă sau etanol de 96%, care conține 1% CHCl_3 în raport de 1 : 3 și se lasă în frigider pentru 6...24 ore la temperatura de 0...4°C (etapa 1). Ca rezultat are loc deshidratarea parțială și micșorarea volumului materiei prime. Solventul se separă și se recuperează, iar masa deshidratată parțial se introduce în aparatul Soxlet și se extrage cu acetonă timp de 2 ore (etapa 2). Ca rezultat are loc deshidratarea și degresarea completă a materiei prime și extragerea concomitentă a substanțelor bioactive solubile în acetonă (lipide, fosfolipide, lipoproteine, glicolipide, glicolipoproteine, nucleotide, enzime etc. cu proprietăți pirogene, fluorogene, antigenice), care ulterior pot contamina produsul final. Utilizarea acetonei este convenabilă, deoarece temperatura de fierbere este relativ joasă (56°C) și dizolvă bine toate tipurile de lipide. Numai după înlăturarea deplină a tuturor substanțelor bioactive cu acțiune toxică masa de crește se scoate din aparatul Soxlet și se usucă în nișa cu ventilație până la dispariția mirosului de acetonă (4...5 ore). În aparatul Soxlet are loc prelucrarea materiei prime în mod continuu, ceea ce la etapa dată permite înlăturarea deplină a apei, grăsimilor și a substanțelor bioactive cu efect negativ, care pot contamina produsele finale, reducerea timpului de lucru și utilizarea unui volum mult mai mic de solvent decât în metodele cunoscute până în prezent. Spre deosebire de procedeul descris în cea mai apropiată soluție, unde pregătirea materiei prime pentru extragerea AH se efectuează numai prin spălare periodic repetată cu cantități mari de alcool și ser fiziologic, operațiile cu aparatul Soxlet sunt mult mai efective și mai ușor de realizat, ceea ce constituie și un avantaj al procedeeului propus.

50

55

După dispariția mirosului de acetonă, masa de crește se hidratează și în același timp din ea se extrage AH, lipsit de lipide, fosfolipide, lipoproteine, glicolipide, glicolipoproteine, nucleotide, enzime etc. (etapa 3). În calitate de extragent pentru AH s-a utilizat soluție apoasă de 1M NaCl. La masa obținută se adaugă soluție de 1M NaCl în raport de 1 : 20 (m/v) față de masa uscată și 2...3 picături de CHCl_3 în calitate de agent bactericid (antiseptic). Amestecul se lasă în frigider pentru 24 ore la temperatura de 4...10°C. Procesele de hidratare și extragere decurg concomitent. Prezența

60

MD 3099 F1 2006.07.31

6

clorurii de sodiu în faza apoasă creează o forță ionică satisfăcătoare în mediul neutru, care facilitează eliminarea AH din țesut. Amestecul se filtrează. Filtratul se colectează, iar la masa de creste deja hidratată se adaugă o porție nouă de extragent și 2...3 picături de CHCl_3 . Procedura se repetă analogic de trei ori. Rămășița după extragere se păstrează în stare congelată pentru prelucrarea ulterioară. Cele 5
3 porții de extras cu conținut de AH se împreunează, se filtrează prin plasă de nailon, se centrifughează la 7000 rot./min timp de 20 min pentru înlăturarea impurităților și particulelor greu solubile. Soluția se răcește până la 4°C, se ajustează pH-ul la 5,0...5,5 cu soluție HCl 0,1 mol/l și se adaugă etanol de 96% rece în raport de 1 : 3. Sedimentul format se separă, se dizolvă în soluție de 1M NaCl, se încălzește 5...10 min până la temperatura de 70...80°C, apoi rapid se răcește până la 10
18...20°C, se ajustează pH-ul la 5,0...5,5 cu soluție HCl 0,1M și se adaugă CHCl_3 în raport de 1 : 1, se agită ușor cu agitator din sticlă într-o singură direcție. Peste 6...24 ore se separă faza apoasă superioară și se colectează, iar faza organică (CHCl_3) și proteinele sedimentate la interfață se înlătură și se recuperează solventul. Procedura se repetă de 3...4 ori până când soluția apoasă rămâne transparentă sau puțin opalescentă (etapa 4). După ultima procedură de deproteinizare pH-ul soluției se ajustează cu soluție diluată de NaOH la 7,5...8,0 și acidul hialuronic se sedimentează din faza apoasă cu etanol de 96% rece în raport de 1 : 3 în formă de sare de sodiu (P1). Randamentul produsului obținut P1 constituie 0,5%. Partea de masă a proteinelor determinată prin metoda Lowry în produsul final nu depășește 1%. Soluția apoasă de 1% AH obținut prin procedeul propus reprezintă un lichid vâcos, greu eculent, străveziu sau puțin opalescent, fără culoare, fără miros. Viscositatea relativă a soluției de 0,1% AH măsurată cu viscosimetrul Ostwald la temperatura de 18°C a fost egală cu 12. Absorbția soluției de 1% AH măsurată la 257 nm (maximul de absorbție a nucleotidelor) și la 280 nm (maximul absorbției pentru proteine) este mai mică de 0,1 un. (l = 10 mm). Spectrul în IR al produsului obținut confirmă autenticitatea AH (fig. 2).

Acidul hialuronic obținut se păstrează în etanol de 96%, în flacoane închise ferite de lumină, la 25 temperatura de 0...4°C.

Rămășița de la etapa 3 se degheață și se adaugă la ea soluție de 1M NaCl în raport volumetric de 1 : 3 și 2...3 picături de CHCl_3 . Amestecul obținut se încălzește pe baie de apă la temperatura de 50...60°C timp de 3 ore (etapa 5). Apoi amestecul se filtrează prin plasă de nailon sterilizată. Filtratul se centrifughează la 7000 rot./min timp de 30 min. El este vâcos și se gelatinizează în frigider. La 30 extractul obținut se adaugă acetonă în raport de 1 : 3 (v/v). Produsul sedimentat (P2) se separă, se spală cu acetonă și se usucă. Analiza produsului obținut P2 a fost efectuată după aceiași parametri ca și analiza produsului P1. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1. La produsul P2 a fost efectuată analiza calitativă și cantitativă a conținutului de proteine la analizatorul de aminoacizi. Pentru analiză s-au dizolvat 58 mg de produs P2 în 10 ml soluție. S-a constatat că produsul P2 conține 64,6% 35 proteine cu compoziția prezentată în tabelul 2. Soluția de 1% a produsului P2 prezintă absorbție în domeniul ultraviolet la lungimea de undă 266,5 nm egală cu 0,609 un. (l = 10 mm).

Procesul de extragere se realizează în 2 stadii. Prima extragere se efectuează la rece în trei reprize și permite obținerea AH cu un conținut scăzut de proteine, care poate fi utilizat atât în domeniul farmaceutic cât și în domeniile cosmetic și alimentar.

A doua extragere se realizează la temperatura de 50...60°C și permite obținerea unei cantități 40 suplimentare de AH cu conținut de proteine. Deoarece preventiv se efectuează o extragere deplină a substanțelor bioactive cu efect negativ, produsul obținut (P2) reprezintă un complex al AH cu proteinele compoziția cărora a fost determinată. Acest produs poate fi utilizat în industria alimentară ca ingredient sau compus de bază în diverse suplimente alimentare și în industria cosmetică la 45 prepararea cremelor, măștilor, șampoanelor, săpunului etc. Produsul P2 poate fi purificat suplimentar de proteine prin procedeul cunoscut.

Exemplu

S-au colectat 160 g de creste de găini și cocoși proaspete, îndată după sacrificarea păsărilor sănătoase, s-au spălat de sânge cu apă rece (10...15°C) în 2...3 reprize timp de 5...6 ore, apoi s-au mărunțit fin, astfel încât dimensiunile fragmentelor erau aproximativ de 1...3 mm. Mărunțirea s-a efectuat în combina Moulinex Genius 2000. La masa mărunțită s-a adăugat acetonă, care conține 1% 50 CHCl_3 în raport de 1 : 3 și s-a lăsat în frigider la temperatura de 0...4°C (etapa 1). După 6 ore solventul s-a separat și s-a distilat, iar masa deshidratată parțial s-a introdus în aparatul Soxlet și s-a extras (degresat) cu acetonă timp de 2 ore (etapa 2). După degresare masa de creste de nailon din aparatul Soxlet și s-a uscat în nișa cu ventilare până la dispariția mirosului de acetonă. După 55 dispariția mirosului de acetonă masa substanței uscate a constituit 37 g.

În calitate de extragent pentru AH s-a utilizat soluția apoasă de 1M NaCl. La masa uscată obținută (37 g) s-au adăugat 750 cm³ soluție de 1M NaCl și 2...3 picături de CHCl_3 . Amestecul s-a lăsat în frigider pentru 24 ore la temperatura de 4...10°C, apoi s-a filtrat. Filtratul s-a colectat, iar la masa de creste deja hidratată s-a adăugat o porție nouă de extragent și 2...3 picături de CHCl_3 . Procedura s-a repetat analogic de trei ori (etapa 3). Rămășița după extragere s-a congelat pentru prelucrarea 60

MD 3099 F1 2006.07.31

7

5 ulterioară. Cele 3 porții de extras s-au împreunat (în total 2 l), s-au filtrat prin plasă de nailon, s-au centrifugat la 7000 rot./min timp de 20 min pentru înlăturarea impurităților și particulelor greu solubile. Soluția s-a răcit până la 4°C, s-a stabilit pH-ul la 5,0...5,5 cu soluție HCl 0,1 M și s-a adăugat etanol de 96% rece în raport de 1 : 3. Sedimentul format s-a separat și s-a dizolvat în 100 cm³ soluție de 1M NaCl, s-a încălzit 5...10 min până la temperatura de 70...80°C, apoi rapid s-a răcit până la 18...20°C, s-a ajustat pH-ul la 5,0...5,5 cu soluție HCl 0,1 M și s-a adăugat CHCl₃ în raport de 1 : 1, s-a agitat ușor cu agitator din sticlă într-o singură direcție, în pâlnia de decantare. Peste 24 ore s-a separat faza apoasă superioară și s-a colectat faza organică (CHCl₃) și proteinele sedimentate la interfață s-au înlăturat, iar solventul s-a distilat. Procedura s-a repetat de 3...4 ori până când soluția 10 apoasă a devenit transparentă sau puțin opalescentă (etapa 4). După ultima procedură de deproteinizare pH-ul soluției s-a stabilit cu soluție diluată de NaOH la 7,5...8,0 și acidul hialuronic s-a sedimentat din faza apoasă cu etanol de 96% rece în raport de 1 : 3 în formă de sare de sodiu (P1). S-au obținut 0,785 g produs. Randamentul produsului obținut P1 constituie 0,5%. Partea de masă a proteinelor, determinată prin metoda Lowry, în produsul final nu depășește 1%. Spectrul în IR al produsului obținut confirmă autenticitatea hialuronatului de sodiu (Fig.2). AH se obține din soluția 15 apoasă a hialuronatului de sodiu la acidulare cu HCl.

Soluția apoasă de 1% AH obținut prin procedeul propus reprezintă un lichid vâscos, greu eculent, străveziu sau puțin opalescent, fără culoare, fără miros. Viscositatea relativă a soluției de 0,1% AH măsurată cu viscosimetrul Ostwald la temperatura de 18°C a fost egală cu 12.

20 Absorbția soluției de 1% AH măsurată la 257 nm (maximul de absorbție a nucleotidelor) și la 280 nm (maximul absorbției pentru proteine) este mai mică de 0,1 un. (l=10 mm).

Acidul hialuronic obținut se păstrează în etanol de 96%, în flacoane închise ferite de lumină, la temperatura de 0...4°C.

25 Rămășița de la etapa 3 s-a dezghețat și s-au adăugat la ea 700 cm³ soluție de 1M NaCl și 2...3 picături de CHCl₃. Amestecul obținut s-a încălzit pe baie de apă la temperatura de 50...60°C timp de 3 ore (etapa 5). Apoi amestecul s-a filtrat prin plasă de nailon sterilizată. Filtratul s-a centrifugat la 7000 rot./min timp de 30 min. El este vâscos și s-a gelatinizat în frigider. La extractul obținut s-a adăugat acetonă în raport de 1 : 3 (v/v). Produsul sedimentat (P2) s-a separat, s-a spălat cu acetonă și s-a uscat. Analiza produsului obținut P2 a fost efectuată după aceiași parametri ca și analiza produsului P1. 30 Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1. La produsul P2 a fost efectuată analiza calitativă și cantitativă a conținutului de proteine la analizatorul de aminoacizi. Pentru analiză s-au dizolvat 58 mg de produs P2 în 10 ml soluție. S-a constatat că produsul P2 conține 64,7% proteine cu compoziția prezentată în tabelul 2. Soluția de 1% a produsului P2 prezintă absorbție în domeniul ultraviolet la lungimea de undă 266,5 nm egală cu 0,609 un. (l = 10 mm).

35

Tabelul 1

Caracteristica produselor obținute

Nr./o	Produsul obținut	Randamentul produsului (%)	Partea de masă a proteinelor (%)	Viscozitatea relativă a soluției (18°C)	Viscozitatea cinematică (St)
1	P1	0,5	1	12	0,13
2	P2	12	64,7	13	0,14

40

Compoziția calitativă și cantitativă a aminoacizilor din produsul P2

Tabelul 2

	?M/100 mg	mg/100 mg	mM/g	azot în mg/100 mg
Acidul aspartic	24,9318	3,2935	0,2493	0,34904
Treonina	11,7768	1,4026	0,1178	0,16488
Serina	15,9810	1,6796	0,1598	0,22373
Acidul glutamic	52,2660	7,6883	0,5227	0,73172
Prolina	13,0443	1,5014	0,1304	0,18262
Glicina	261,0336	19,5958	2,6103	3,65447
Alanina	53,1720	4,7371	0,5317	0,74441
Valina	17,7482	2,0783	0,1775	0,24848
Cisteina	46,7801	5,6206	0,4678	1,30984
Metionina	26,2385	3,9148	0,2624	0,36734
Izoleucina	12,5406	1,6453	0,1254	0,17557
Leucina	19,3458	2,5382	0,1935	0,27084

MD 3099 F1 2006.07.31

8

Tirozina	15,2280	2,7593	0,1523	0,21319
Fenilalanina	11,2201	1,8536	0,1122	0,15708
Lizina	15,0103	2,1944	0,1501	0,42029
Histidina	7,6302	1,1839	0,0763	0,32047
Triptofan	3,0765	0,6282	0,0308	0,08614
Arginina	1,7756	0,3093	0,0178	0,09943
Amoniac	7,5397	0,1284	0,0754	0,10556
Σ aminoacizilor	608,7993	64,6242	6,0880	9,71955
Σ ind.schimb.azot.	616,3389	64,7526	6,1634	9,82510

5 (57) Revendicare:

Procedeu de obținere a hialuronatului de sodiu, acidului hialuronic și complexului acid hialuronic-proteină care include spălarea creștelor de cocoși, găini cu apă la temperatura de 10...15°C timp de 5...6 ore, mărunțirea și deshidratarea lor în acetonă sau etanol de 96%, care conține 1% CHCl₃, în raport de 1:3, după care se lasă pentru 6...24 ore la temperatura de 0...4°C, apoi solventul se separă și se efectuează deshidratarea suplimentară și degresarea cu acetonă în aparatul Soxhlet timp de 2 ore, sedimentul obținut se usucă și se supune extragerii cu soluție apoasă de 1M NaCl în două stadii: I stadiu la rece la 4...10°C și al II-lea stadiu la încălzire până la 50...60°C, totodată la I stadiu se efectuează extragerea în raport de 1:20 de trei ori, se separă rezidul de extract, după care se efectuează sedimentarea acidului hialuronic din extract cu etanol de 96% în raport de 1:3, sedimentul se redizolvă și se elimină proteinele din el la încălzire și răcire la pH 5,0...5,5, se adaugă CHCl₃ în raport de 1:1, se separă faza apoasă, se tratează cu etanol de 96% în raport de 1:3, se separă sedimentul format de hialuronat de sodiu cu un conținut de proteină de cel mult 1%, iar acidul hialuronic se obține la acidularea cu HCl a soluției apoase de hialuronat de sodiu; la al II-lea stadiu rezidul obținut la I stadiu se extrage în raport de 1:3, apoi se sedimentează cu acetonă obținând un complex acid hialuronic-proteină cu un conținut de proteină de 65%.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. US 4141973 1979.02.27
2. RU 2055079 C1 1996.02.27
3. RU 2074196 C1 1997.02.27
4. RU 2115662 C1 1998.07.20
5. MD 1617 G2 2001.02.28

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

EGOROVA Tamara

Redactor:

CANȚER Svetlana

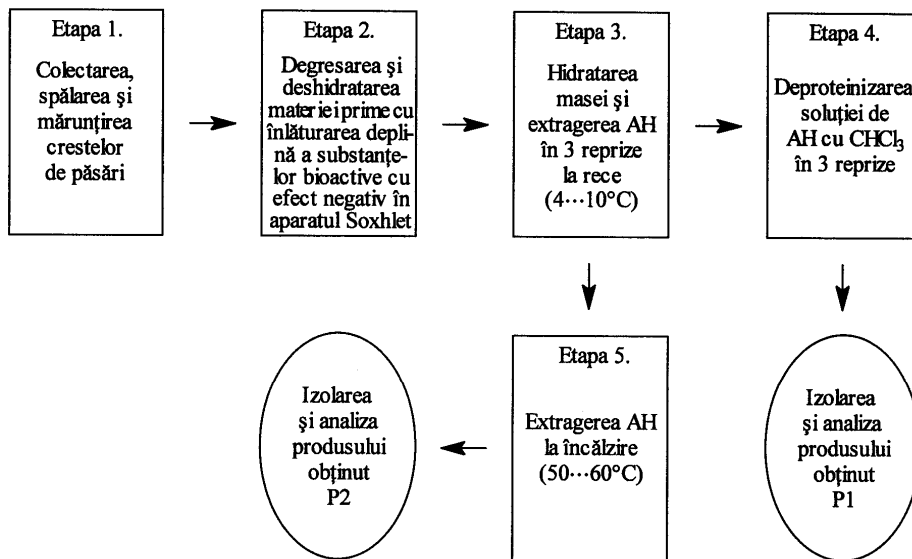


Fig. 1

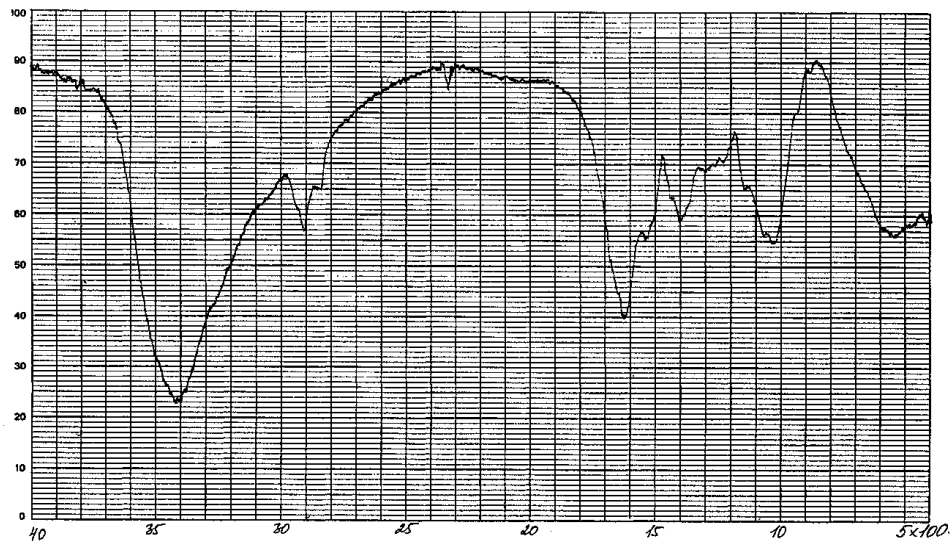


Fig. 2